

## LA CULTURE D'UN CHAMPIGNON PAR LES FOURMIS ATTINES

Mise en évidence de phénomènes d'antibiose dans le nid

par J. ANGELL-PAPA\*

**RÉSUMÉ.** — Les fourmis de la tribu des Attines, communément appelées fourmis manioc, maintiennent dans leurs nids la monoculture d'un champignon qu'elles exploitent comme source de nourriture. Par quels processus le champignon cultivé reste-t-il dominant dans les conditions naturelles ? Nous avons montré que l'inhibition de la microflore bactérienne est due au maintien d'un pH voisin de 5,0 (sécrétions acides des fourmis). En outre, les champignons cultivés par les genres *Acromyrmex* et *Atta* manifestent des phénomènes d'antibiose vis-à-vis des bactéries. Cette activité antibiotique amplifie l'action précédente.

**SUMMARY.** — Attine ants (leaf-cutting ants) cultivate a single fungus in their nests and utilize this fungus as their food source. How the ants succeed in maintaining their fungus culture in spite of contamination in natural condition ? We have show that the main reason of the inhibition is due to the acidity of pH (pH = 5,0 acid secretions). The fungus associated with the genera *Acromyrmex* and *Atta* are ■ source of antibiotics; this antibiotic activity complete the precedent action.

**MOTS CLÉS :** Attines, Champignon, Flore microbienne, Antibiose.

### INTRODUCTION

La culture d'un champignon est une des pratiques les plus remarquables des fourmis de la tribu des Attines, bien connues dans les régions tropicales américaines (WEBER, 1979). Sur les fragments végétaux transportés et emmagasinés dans les nids souterrains, les fourmis maintiennent la monoculture d'un champignon qu'elles exploitent comme source de nourriture (QUINLAN & CHERETT, 1979). La vie de la société et l'extension des espèces repose sur la réussite de la culture.

\* Ce travail a été réalisé au Centre de Recherches des Antilles Guyane, Petit Bourg, Guadeloupe, 97170.

Adresse actuelle : Muséum National d'Histoire Naturelle, Laboratoire de Cryptogamic, 12 rue Buffon, 75005 Paris.

Par quel mécanisme ce champignon cultivé reste-t-il dominant dans le milieu contaminé que représente le nid ? En effet, il existe dans cet écosystème de nombreux champignons compétiteurs (ANGELI-PAPA J., non publié) et une flore bactérienne importante (PAPA F. & PAPA J., 1982). Le nid héberge également des levures, mais celles-ci ne semblent pas entrer en compétition avec le champignon cultivé (CRAVEN & al., 1970).

Lors d'une étude précédente (PAPA J. & PAPA F., 1982) nous avons montré que le maintien dans le nid d'un pH voisin de 5,0 était capable d'inhiber la croissance des bactéries. A cet effet majeur pourrait s'adjoindre l'action d'autres composés chimiques possédant des propriétés inhibitrices. Ces substances pourraient être apportées par les végétaux, la fourmi ou les champignons.

CHERRETT (1972) a constaté que la fourmi effectue un choix de récolte parmi les végétaux de l'environnement. Si le choix n'a pas d'influence directe sur le développement du champignon, il est permis de penser qu'il peut exercer une action vis-à-vis des compétiteurs bactériens.

L'hypothèse d'un contrôle possible par un antibiotique a été émise dès 1954 par SUTER. Par la suite, WEBER (1955) a suggéré qu'il pouvait s'agir d'un agent chimique présent dans la salive des fourmis. Les travaux de MARTIN & al. (1969) qui tentaient de vérifier cette hypothèse ont abouti à un échec. Aucun antibiotique n'a pu être décelé chez les fourmis ni dans la culture de leur champignon. Les travaux de MASCHWITZ & al. (1970), de SCHILDKNECHT (1971), SCHILDKNECHT & KOOK (1971) et SCHILDKNECHT & al. (1973) apportent des preuves expérimentales à l'hypothèse d'un contrôle chimique. Des glandes métathoraciques d'*Atta sexdens*, ces chercheurs isolent la myrmicacine (ou acide hydroxydecanoïque), l'acide phénylacétique, l'acide indolylacétique. Ces acides carboxyliques formés en petites quantités dans les glandes et émis de manière continue dans le nid pourraient, selon ces auteurs, jouer un rôle protecteur en inhibant la croissance des microorganismes étrangers.

Enfin, le champignon peut jouer un rôle de prévention dans la contamination du nid. HERVEY & NAIR (1979) ont apporté un argument en faveur de cette théorie en isolant un antibiotique, la lipochlorine, à partir du champignon cultivé par une espèce primitive, *Cyphomyrmex costatus*.

Le but de ce travail est de compléter ces recherches en essayant de préciser le rôle joué par les divers partenaires du nid que sont les végétaux, la fourmi et son champignon vis-à-vis des compétiteurs bactériens.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1.- MÉTHODE

#### Souches bactériennes utilisées

Pour mettre en évidence l'activité inhibitrice, nous avons utilisé huit souches bactériennes. Six d'entre elles sont des souches provenant de la collection de

L'Institut Pasteur et deux ont été isolées en Guadeloupe. Leurs caractéristiques sont résumées dans le Tableau I.

Provenance	Gram	Désignation	Référence	Marquage
Institut Pasteur	+	<i>Bacillus subtilis</i>	53.174	B.S.
	+	<i>Sarcina lutea</i>	53.45	S.L.
	+	<i>Staphylococcus aureus</i> Oxford	A.268	S.O.
	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A.13	P.P.
	-	<i>Serratia marcescens</i>	A.173	S.M.
	-	<i>Escherichia coli</i> K 12	C.600	K.12
Guadeloupe	-	<i>Chromobacterium violaceum</i>		C.V.
	-	<i>Salmonella panama</i>		S.P.

Tableau I. — Caractéristiques des souches bactériennes utilisées.

Table I. — Characteristics of the utilized bacterial strains.

Les germes tests provenant d'une culture de 24 heures sont mis en suspension dans un bouillon nutritif gélosé à 2 g p. 1000. Leur densité est calculée de manière à obtenir, après culture, des colonies séparées. La suspension est utilisée soit en étalement de surface, soit sous forme de gouttes.

#### Choix et provenance des végétaux

Les différents échantillons de feuilles et fleurs étudiés pour leur activité inhibitrice ont été prélevés sur plusieurs espèces habituellement récoltées dans l'environnement par *Acromyrmex octospinosus*. Il s'agit de : Hibiscus (*Hibiscus rosa-sinensis*), Flamboyant (*Delonix* sp.), Citronnier (*Citrus* sp.), Manioc (*Manihot* sp.), Igname (*Discorea trifida*), Mapou (*Cordia* sp.).

#### Récolte des fourmis

Il s'agit d'*Acromyrmex octospinosus*, seule espèce présente en Guadeloupe.

#### Souches de champignons

Provenance	Espèce fourmi	Référence	Marquage
Guadeloupe	<i>Acromyrmex octospinosus</i>	7801	A 1
		7802	A 2
		7804	A 6
		7805	A 7
Guyane	<i>Atta cephalotes</i>	7901	A 3
		8009	A 16
	<i>Atta sexdens</i>	7902	A 4
		8008	A 15

Tableau II. — Caractéristiques des souches de champignons utilisées.

Table II. — Characteristics of the utilized fungal strains.

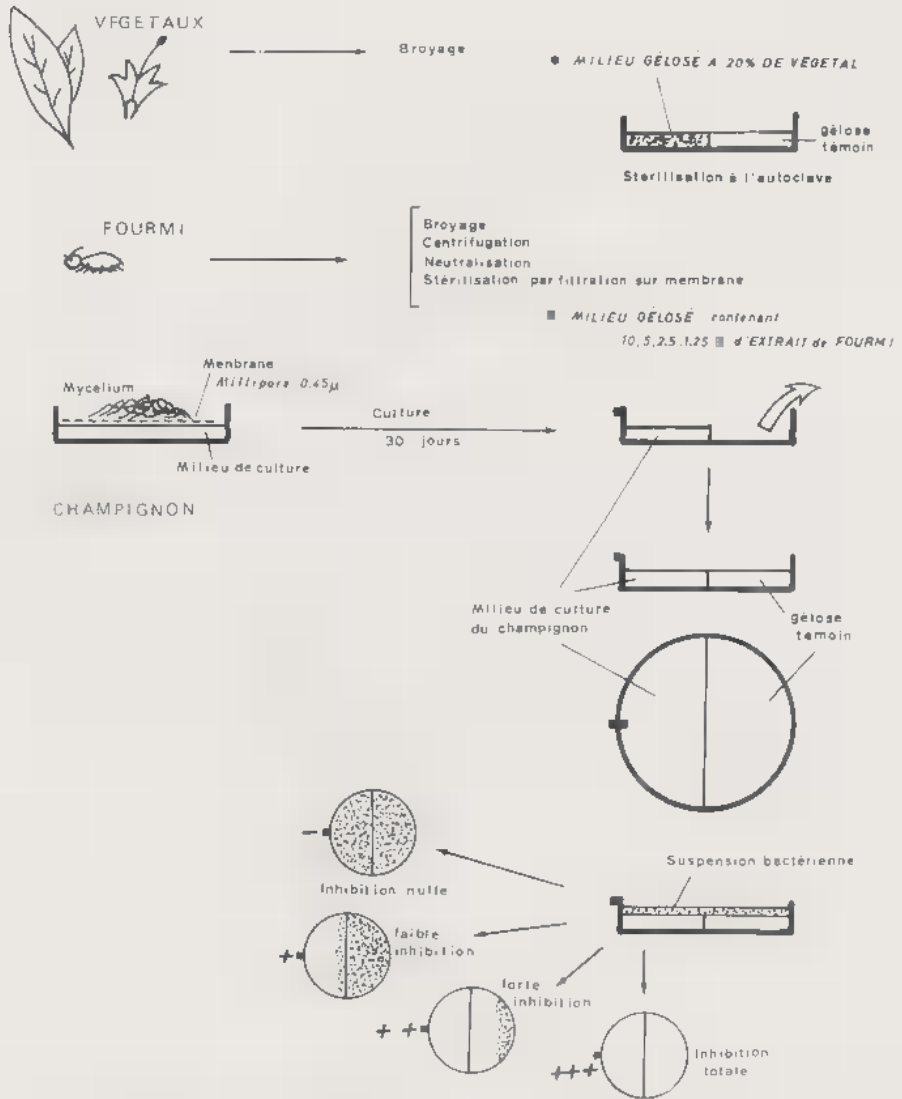


Fig. 1. — Méthodes d'étude- Préparation des milieux de culture à base de végétaux, de fourmis et de champignons. Évaluation de l'inhibition.

Fig. 1. — Methods - Preparation of the several cultural media : natural media with leaves extracts, ants extracts and fungi extracts. Evaluation of the inhibition.

Elles ont été isolées de nids de différentes espèces de fourmis champignonnistes. Leurs caractéristiques figurent dans le Tableau II. Ces souches proviennent des départements français de Guadeloupe et de la Guyane. Les souches d'*Acromyrmex* en provenance de Guadeloupe ont été isolées dans différents lieux du département. Un article antérieur (BARBIER & al., 1981) a précisé leur identité sur le plan immunologique.

## 2.-MÉTHODES D'ÉTUDE

Outre la gélose témoin, différents milieux sont préparés à partir de végétaux, fourmis et champignons (Voir schéma, fig. 1).

Gélose témoin : agar 15 g, ClNa 8,5 g, eau 1000 ml.

Végétaux : Les jeunes feuilles et fleurs récoltées, lavées, sont broyées finement. Ce broyat est utilisé pour la fabrication d'un milieu gélosé où sa concentration est de 20 %. (200 g de feuilles pour 1 litre d'eau).

Fourmis : Les fourmis proviennent d'un nid d'*Acromyrmex octospinosus*; seuls les éléments adultes sont utilisés dans notre expérience.

Champignons : Les différentes souches de champignons sont cultivées sur le milieu suivant : glucose 10 g, malt 3 g, levure 3 g, peptone 5 g, eau distillée 1000 ml, agar 15 g. L'inoculum est déposé sur une membrane millipore de porosité 0,45  $\mu$  qui couvre la surface du milieu (Fig. 1). Après 30 jours de culture la membrane et le champignon sont enlevés et la gélose sous-jacente est seule utilisée dans nos essais. La moitié du milieu est enlevée stérilement et remplacée par la gélose témoin. Le milieu final estensemencé en surface par une couche de gélose molle contenant des bactéries.

La lecture des différents essais est effectuée après une incubation de 48 h à l'étuve à 37°C.

## RÉSULTATS

### 1- Milieux végétaux

La suspension bactérienne se développe uniformément à la surface de tous les milieux préparés avec différents végétaux. Aucune inhibition n'est à signaler.

### 2- Milieux à base de fourmis

De même, sur ces milieux, aucune inhibition n'est à signaler.

### 3- Action des différentes souches de champignon.

Les résultats obtenus figurent sur le Tableau III. Toutes les préparations obtenues après culture des souches fongiques associées à *Acromyrmex octospinosus*, *Atta sexdens*, et *Atta cephalotes* inhibent les différentes souches bactériennes. L'activité antibactérienne dépend, comme l'indique le Tableau III,

Champignons utilisés	Souches bactériennes							
	BS	SL	SO	BP	SM	K 12	CV	SP
A 1	+	++	++	+	+	++	++	++
A 2	++	++	++	+	++	+	++	+
A 6	++	+++	++	++	++	+++	++	++
A 7	++	+++	+	+	++	++	++	++
A 3	++	+++	++	+++	++	+++	++	+
A 16	++	++	++	++	+	++	++	+
A 4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
A 15	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
TEMOIN O	Culture en colonies séparées							

Tableau III. — Action des substances émises par les champignons (souches cultivées par *Acromyrmex octospinosus*, *Atta sexdens* et *Atta cephalotes*) sur différentes souches bactériennes. - Évaluation de l'inhibition : voir fig. 1.

Table III. — Activity of the substances, produced by the fungus cultivated by *Acromyrmex octospinosus*, *Atta sexdens* and *Atta cephalotes* on different bacterial strains. - Evaluation of the inhibition : see fig. 1.

de la souche de champignon utilisée ainsi que des souches bactériennes. Les facteurs présents dans le milieu, après culture d'un champignon, agissent à la fois sur les bactéries gram positif et gram négatif.

### DISCUSSION ET CONCLUSION

En dehors de l'action inhibitrice provoquée par les sécrétions acides des fourmis, nous avons étudié la possibilité d'une action supplémentaire causée par les différents partenaires du nid. Dans les conditions de notre expérience, les végétaux, quoique sélectionnés par les fourmis, n'exercent aucune influence sur le ralentissement du développement bactérien. Il en est de même pour les milieux à base de fourmis.

Comme l'avaient précédemment remarqué HERVEY & NAIR, à propos de *Cyphomyrmex costatus*, les différentes souches de champignons cultivés par

*Acromyrmex octospinosus*, *Atta sexdens* et *Atta cephalotes* exercent une action inhibitrice certaine vis-à-vis des différentes souches bactériennes utilisées. Il est cependant permis de penser que cette action reste faible puisqu'elle n'a pas été décelée par MARTIN & al. (1969), ni dans notre étude antérieure du nid (PAPA J. & PAPA F., 1982). L'activité antibactérienne dépend en partie des méthodes d'investigation. Nous avons employé une méthode utilisant la libération de substance durant les 30 jours de culture mycélienne, ce qui a permis la mise en évidence de l'inhibition. La présence d'antibiotique dans le milieu de culture est ainsi démontrée; cette action antibiotique, du fait de la faible concentration reste probablement bactériostatique (comme les résultats de l'étude microbiologique du nid l'avaient montré, PAPA F. & PAPA J., 1982; aucun effet léthal ne se manifestant dans le nid).

Il ne faut pas négliger, dans le maintien de la dominance, certains caractères de technique culturale qui tendent à privilégier le champignon cultivé. La localisation du nid dans le sol assure des conditions d'environnement constantes (température 25°-27°, humidité 80 %, taux de CO<sub>2</sub> élevé) qui favorisent la croissance végétative du champignon. La fabrication du substrat (QUINLAN & CHERRETT, 1977) où interviennent les sécrétions salivaires et les liquides fécaux, l'inoculation par bouturage mycélien sans phase de latence, l'importance de l'inoculum de masse permettent un envahissement extrêmement rapide du substrat.

En résumé, l'inhibition des bactéries dans le nid se réalise de la manière suivante :

- Inhibition majeure par un pH maintenu constamment ■ voisinage de 5.
- Action de facteurs de sécrétion contenus dans les glandes métathoraciques (SCHILDKNECHT, 1971)
- Action d'antibiotiques émis par le champignon cultivé.

L'identification de ces substances antibiotiques émises par les champignons nécessiterait des études supplémentaires. Le fonctionnement de cet équilibre biologique favorisant la prédominance du champignon cultivé est remarquable. Il est assuré par la présence active des fourmis et les propriétés bactériostatiques particulières du champignon cultivé par les Attines.

#### BIBLIOGRAPHIE

- BARBIER D., PAPA J. & PAPA F., 1981 — Étude sérologique préliminaire du champignon cultivé par la fourmi manioc, *Acromyrmex octospinosus* Reich en Guadeloupe. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 74 : 164-170.
- CHERRETT J.M., 1972 — Some factors involved in the selection of vegetable substrate by *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera : Formicidae) in tropical rain forest. *J. Anim. Ecol.* 41 : 647-660.
- CRAVEN S.E., DIX M.W. & MICHAELS G.E., 1970 — Attine Fungus Gardens contain

- yeast. *Science* 169 : 184-186.
- HERVEY A. & NAIR M.S.R., 1979 — Antibiotic metabolite of a fungus cultivated by gardening ants. *Mycologia* 71 : 1064-1066.
- MARTIN M.M., Mac CONNELL J.G. & GALE G.R., 1969 — The chemical basis for Attine ant fungus symbiosis. Absence of antibiotics. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 62 : 386-388.
- MASCHWITZ U., KOOB K. & SCHILDKNECHT H., 1970 — Ein Beitrag zur Funktion der metathoracaldrüse der Ameisen. *J. Insect Physiol.* 16 : 387-404.
- PAPA F. & PAPA J., 1982 — Étude de l'activité microbiologique dans les nids d'*Acromyrmex octospinosus* Reich en Guadeloupe. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 75 : 404-414.
- PAPA J. & PAPA F., 1982 — Inhibition des bactéries dans les nids d'*Acromyrmex octospinosus* Reich en Guadeloupe. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 75 : 415-425.
- QUINLAN R.J. & CHERRETT J.M., 1977 — The role of substrate preparation in the symbiosis between the leaf cutting ant *Acromyrmex octospinosus* Reich and its food fungus. *Ecol. Entomol.* 2 : 161-170.
- QUINLAN R.J. & CHERRETT J.M., 1979 — The role of fungus in the diet of the leaf cutting ant *Atta cephalotes* (L.). *Ecol. Entomol.* 4 : 151-160.
- SCHILDKNECHT H., 1971 — Sommets d'évolution dans la chimie défensive des insectes. *Endeavour* 30 : 136-141.
- SCHILDKNECHT H. & KOOB K., 1971 — Myrmicacin, the first herbicide. *Angew. Chem.* 10 : 124-125.
- SCHILDKNECHT H., REED D. & KOOB K., 1973 — Auxin activity in the symbiosis of leaf cutting ants and their fungus. *Insect Biochem.* 3 : 439-442.
- SUTTER V., 1954 — The possibility of antibiotic control of the microflora of the Bachac nest. *Trans. 5th Intern. Congr. Soil Sci.* 5 : 113-118.
- WEBER N.A., 1955 — Pure cultures of fungi produced by ants. *Science* 122 : 109.
- WEBER N.A., 1979 — Insect Fungus Symbiosis : Fungus culturing by Ants. Allanheid, Osmum, Monclair, Batra Ed., 77-116.

